

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора біологічних наук, професора Федоти Олени Михайлівни на дисертаційну роботу Шиманської Іванни Єлисеївни «Мутації гена *ATP7B* у пацієнтів з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями та хворобою Вільсона», поданої на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 09 – «Біологія», за спеціальністю 091 – «Біологія».

Актуальність теми дисертаційного дослідження. У теперішній час доцільність досліджень схильності до розвитку патологій гепатобіліарної системи, особливо неуточненого генезу, обумовлена їх високими популяційними показниками, статеві-віковими особливостями, варіабельністю клінічних проявів, складністю встановлення точного діагнозу, можливою інвалідизацією, витратами на медичний супровід та зниженням якості життя родин хворих. Важливим сучасним інструментом для вирішення завдань профілактики, попередження та своєчасного лікування зазначеного кола порушень є генетичне тестування кандидатних генів. На сьогоднішній день в Україні практично немає науково обґрунтованого алгоритму визначення спектру мутацій генних мереж патологій шлунково-кишкового тракту. Розробка та впровадження оптимальних економічно та технологічно схем молекулярно-генетичного аналізу мутацій гена *ATP7B*, асоційованих із хворобою Вільсона, дозволить впровадити їх у клінічну практику. Таким чином, тема дослідження, обрана авторкою дисертаційної роботи, є своєчасною та актуальною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота виконана у ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України» відповідно до планів науково-дослідних робіт установи та була фрагментом комплексних тем, які виконувалися в інституті: "Дослідження генетичних чинників обтяженого клінічного перебігу моногенних і мультифакторних захворювань" (№ держ. реєстрації 0117U000655, 2017 –2019 рр.), «Аналіз чинників ранньої діагностики

генетично зумовленої патології людини на прикладі вибраних моногенних та мультифакторних хвороб» (№ держ. реєстрації 0117U000655, 2020 –2021 рр.)

Дослідження виконувалося в межах наукової співпраці відповідно до угоди між ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України» та Ризьким Медичним університетом імені П. Страдиня.

Наукова новизна одержаних результатів. Автором, за результатами секвенування кодуючої послідовності, вперше описано спектр мутацій гена *ATP7B*, характерних для пацієнтів з хворобою Вільсона з України. Показано, що міссенс-заміна с.3207С>А в гені *ATP7B* є мажорною для осіб з хворобою Вільсона в Україні. Визначено популяційні показники, пов'язані з мутацією с.3207С>А гена *ATP7B* серед загальної вибірки мешканців західних областей України. Також, у мешканців України оцінено кількісні та якісні показники мутацій інших генів, пов'язаних із патологіями гепатобіліарної системи.

Практичне значення отриманих результатів. Автором запропоновано алгоритм генетичного тестування генів-кандидатів ідіопатичних гепатобіліарних порушень. Встановлено внесок мутацій гена *ATP7B*, *HFE* та *UGT1A1* в етіологію ідіопатичних гепатобіліарних захворювань в осіб молодого віку. Розроблено молекулярно-генетичне дослідження частих мутацій гена *ATP7B* методом ПЛР Ві-PASA та аналізом ПДРФ. Апробовано різні молекулярно-генетичні підходи для визначення алелю А(ТА)₇ТАА гена *UGT1A1*, зокрема, в осіб з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями. За результатами роботи видано інформаційний лист «Генетичне тестування мажорних мутацій гена *ATP7B* для пацієнтів з клінічними ознаками хвороби Вільсона» (Рішення Вченої Ради ДУ «ІСП НАМН України» № 10 Від 4 жовтня 2021).

Ступінь обґрунтованості достовірності наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. У дисертаційній роботі І. Є. Шиманської представлено обґрунтування наукових положень, запропонованих на підставі результатів молекулярно-генетичних досліджень. Представлена робота має послідовний дизайн дослідження. Для реалізації

мети дисертантом вирішувалися представлені завдання, яким відповідають отримані результати, підсумовані у висновках. Дисертантом детально опрацьована література з теми дослідження, підібрано та використано сучасні методи для проведення різних видів генетичного аналізу, зібрано великий об'єм первинного матеріалу, представлено отримані результати та наведено дані про впровадження їх у практичну діяльність.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 154 сторінках тексту, матеріали дисертації ілюстровано 19 таблицями та 30 рисунками. Список використаних джерел налічує 150 найменування, з них - 29 кирилицею, - 121 латиницею. Виклад матеріалу логічно пов'язаний з поставленою метою та завданнями, висновки, в цілому, відповідають поставленим завданням. У дисертації представлені усі необхідні розділи: вступ, огляд літератури, матеріали і методи дослідження, результати власних досліджень, узагальнення, висновки.

Повнота огляду та аналізу літератури у напрямі дослідження. В огляді літератури автор всебічно та критично аналізує наукову літературу, присвячену питанням сучасного стану проблеми генетики ідіопатичних гепатобіліарних порушень. Представлено дані щодо внеску мутацій кандидатних генів людини, у розвиток хвороби Вільсона, хвороби Жильбера, спадкового гемохроматозу. Наведено інформацію про розподіл мутацій у різних країнах та етнічних групах. Матеріали розділу аналізу літературних джерел підводять до розуміння необхідності проведення представленого дослідження.

Якість використаних методів досліджень, отриманих результатів, їх аналізу та обговорення. Дисертантом представлено відомості про об'єкт та методи дослідження, про використаний великий об'єм первинної інформації, медичної документації, зразків біологічного матеріалу. Автором використано традиційний спектр методів для дослідження у межах обраної тематики - полімеразна ланцюгова реакція (класична ПЛР та її модифікації Bi-PASA), полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі (RT-PCR) та аналіз кривих

плавлення високої роздільної здатності (HRM), методи електрофорезу, поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ), аналіз делецій\дуплікацій MLPA, прямого автоматичного секвенування за Сенгером. Результати дослідження викладено у наочній формі, у вигляді таблиць, рисунків, співставлено с даними світової літератури.

В першому розділі результатів досліджень представлено дані щодо аналізу кандидатних генів серед населення Західного та інших регіонів країни, зокрема, визначення мутації $c.3207C>A$ гена *ATP7B*. Автором надано інформацію щодо оптимальних методів проведення аналізу, представлено результати генетичного тестування та обгрунтовано підходи до прогнозування популяційних показників, пов'язаних, зокрема, із мутацією гена *ATP7B*. За результатами цього розділу роботи запропоновано підходи до тестування мутації $c.3207C>A$ гена *ATP7B*. Також розділ містить інформацію щодо оцінки мутацій $c.187C>G$ та $c.845G>A$ гена *HFE*, асоційованого зі спадковим гемохроматозом. Генотипування проведено автором методом ПЛР з подальшим ПДРФ аналізом у 2% агарозному гелі. Надано інформацію щодо результатів тестування алелю $A(TA)_7TAA$ гена *UGT1A1*, пов'язаного із хворобою Жильбера. В розділі «Молекулярно-генетичний аналіз алельних варіантів генів-кандидатів ідіопатичних гепатобіліарних порушень серед осіб дослідної групи» дисертантка представляє результати дослідження мутацій серед хворих, отримані за допомогою різних методів молекулярно-генетичного аналізу, при застосуванні яких патогенні алелі виявляються ефективніше. Наступний розділ присвячено результатам секвенування послідовності гена *ATP7B* серед осіб з групи ризику розвитку хвороби Вільсона та оцінено фенотипові ефекти встановлених мутацій. Останній розділ присвячено матеріалам щодо практичного застосування алгоритму генетичного тестування визначених генів в умовах лабораторії генетичних досліджень ДУ «ІСП НАМНУ». Автором впроваджено генетичне тестування мутації $c.3207C>A$ методом PCR BI-PASA в дублях з використанням двох різних наборів праймерів.

Висновки, представлені у дисертації, логічно витікають із представлених результатів досліджень, цілком відображають основний зміст роботи і привертають увагу до основних моментів проведенного дослідження.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційного дослідження в практиці. Отримані дисертантом дані є базою для подальшої роботи з впровадження ефективної методології генетичного тестування мутацій, пов'язаних з патологіями із ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями. Запропонований автором алгоритм пропонується для використання результатів його застосування фахівцями, які проводять диференційну діагностику серед пацієнтів з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями, особливо в молодому віці. Алгоритм має переваги для практичного використання, оскільки дозволяє встановити генотипи, асоційовані із хворобами, до початку маніфестації клінічних ознак, що є надзвичайно актуальним.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих наукових працях. Основні положення роботи представлено у 14 наукових працях. З статей одну опубліковано у виданні, яке включено до міжнародної наукометричної бази Scopus, 2 – у міжнародних виданнях, 4 – у наукових фахових виданнях України, 7 – у збірнику наукових праць; Результати дисертації було обговорено на міжнародних та національних конгресах та конференціях, що відображено у публікаціях тез доповідей.

Результати перевірки дисертаційної роботи на плагіат програмою «Unicheck» показали ступінь унікальності тексту на рівні 79,6%.

При рецензуванні дисертаційної роботи виникли деякі побажання, запитання та зауваження.

Зауваження щодо форми вираження думок та подання матеріалів у роботі:

1. Зокрема, порушення пунктуації та неузгодженість слів у реченнях, повтори абзаців тексту (с.21, с.84), замість посилань на номери джерел – джерела (с.20), друкарські помилки. Невдалі, некоректні висловлювання загального характеру (с.63. «Температуро – часові показники», С. 87 – «алель-ризику...

алель ризику»). У математичному запису рівняння Харді-Вайнберга замість показника ступеня встановлено коефіцієнт 2 після змінних, що надає інший зміст рівнянню (с. 73). Є невідповідність нумерації таблиць та посилань на них у підрозділі 3.3.

2. У переліку наукових праць позиція 10 не містить вихідних даних.

3. В Огляді літератури окремі підрозділи (наприклад, розділ 1.1., якій займає дві сторінки), містять одно посилання на джерело. Подібні зауваження до розділів 1. 1. 1., 1.3. та інших. У розділі Матеріали та методи на с.58. немає посилання на джерела, з яких отримано послідовності праймерів, використаних у роботі.

4. Наведених автором методів дослідження на с.61, «аналіз генеалогічної інформації, лабораторні (ДНК-діагностика), статистична аналіз отриманих результатів», у представленому вигляді не існує.

5. У Результатах на с.116 таблиця 3.10 має назву «Зв'язок генотипу, фенотипу й біохімічних показників у дітей з генетично підтвердженим діагнозом хвороба Вільсона», але показників чи аналізу зв'язку автором не представлено. Крім того, біохімічні показники осіб, що мають відповідні діагнози, залишають враження перенесених з результатів біохімічного аналізу пацієнтів, без належного оформлення матеріалу у таблиці.

6. Уявляються недоречними багаторазові згадки «випадків», «клінічних описів», «несвоєчасної діагностики», рекомендації лікарям, наприклад, «мають викликати особливу настороженість у лікарів» та інші. Зауваження щодо діяльності колег інших спеціальностей є зайвими.

Питання та зауваження щодо термінології та змістовних позицій роботи:

7. Зауваження до назви роботи. Формулювання назви роботи не охоплює всю широту спектра матеріалів та результатів, представлених у роботі. З іншого боку, тема роботи затверджується на початку наукового шляху дисертанта, і в цьому випадку авторка дисертації під керівництвом своїх наставників зробила кроки за межі поставлених на початкових етапах кордонів.

8. У розділі Матеріали та методи зустрівся термін «генетичний анамнез», який уявляється некоректним у згаданому контексті. Зустрічаються невдалі чи некоректні вирази, наприклад, «15 випадків гомозиготності» (с.112., с.115., с.129.), «Встановлено внесок спадкових мутацій гена *ATP7B*, *HFE* та *UGT1A1* в етіологію ідіопатичних гепатобіліарних захворювань в осіб молодого віку» (с.24), «носійство найпоширеніших спадкових генетичних чинників» («були обстежені на носійство найпоширеніших спадкових генетичних чинників»), с.99, с.125, та ін.

9. На с.111, у таблиці 3.8 очікувані ефекти наведених алелів представлено характеристиками з різних класифікацій.

10. У Результатах, на сторінці 114 в кінці розділу 3.3. та у висновку 3 представлено незрозумілі результати «У осіб з клінічними ознаками хвороби Вільсона, тобто тих, які набрали 3 та більше балів відповідно до бальної системи діагностичних тестів – у 43/56 (частота алелю 82.6%)». Далі вказано, що «Серед генетично верифікованих випадків частота мажорної мутації *c.3207C>A* (H1069Q) гена *ATP7B* сягає 88%, що вказує на...». В той же час у висновку 3 автор підсумковує, що «Серед осіб з України з хворобою Вільсона частота мажорної мутації *c.3207C>A* (H1069Q) гена *ATP7B* складає 82,6%».

11. На стор. 4, позиція 2 наукової новизни містить дані, що «частота цього алелю (*c.3207C>A* в гені *ATP7B*) серед генетично підтверджених випадків становить 82,6%». Першоджерело - с. 112, де у таблиці 3.9 автор називає представлені результати частотою алеля - «Частота алелю *c.3207C>A* серед генетично верифікованих випадків становить 82,6%», що не відповідає наведеним у тексті значенням.

12. Незрозумілою є фраза про частоту алелю в гомозиготному стані та наведені показники. «Апробовано різні молекулярно-генетичні підходи для визначення алелю *A(TA)₇TAA* гена *UGT1A1* і визначено його частоту (9,3%) в гомозиготному стані серед осіб з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями». На с. 90 - «Генетичне тестування алелю *A(TA)₇TAA* гена *UGT1A1* серед осіб з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями показало

низьку частоту цього алелю в гомозиготному стані серед досліджуваної вибірки – 9,2% (4/43), не зважаючи на встановлену високу частоту алелю A(TA)₇TAA в популяції (35,0% - 165/488)». С. 124, Узагальнення - «Частота алелю A(TA)₇TAA в гомозиготному стані, який асоціюється з розвитком синдрому Жильбера серед вибірки практично здорових мешканців західних областей України, становить 12,2%». На с. 124 авторка пише «тестування алелю A(TA)₇TAA гена *UGT1A1* серед осіб з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями дозволює встановити його частоту, яка становить 9,3% (4/43)».

13. На с.119 наведено «Базуючись на встановленому в роботі показнику гетерозиготного носійства мутації c.3207C>A серед мешканців західних областей України (1 на 57) та частці цього алелю серед пацієнтів з хворобою Вільсона (82,6%), частота гетерозиготного носійства різних мутантних алелів гена *ATP7B* сягає 1 : 43». Останній показник зустрічається вперше у ітоговому абзаці та в Узагальненні.

14. На с. 123 узагальнено, що «частота гетерозиготного носійства мутації c.845G> A гена *HFE* у загальній вибірці мешканців західних областей України на рівні 1,3%», що не відповідає даним у відповідному розділі власних досліджень, тому не є підставою для обговорення.

15. Доцільно було б вказати у позиції 4 наукової новизни показники з опублікованих даних, на які посилається автор для порівняння власних результатів. Тому далі з'являються загальні вирази, наприклад, Практичне значення – «Отримані результати вказують на вищу очікувану частоту генотипу хвороби Вільсона».

16. На ст. 4 представлено інформацію «Далі визначали частоту алельних варіантів гена *HFE*, для яких доведено асоціацію з розвитком спадкового гемохроматозу. *HFE* генотипи c.845G>A/c.845G>A; c.187C>G/c.845G>A виявлено у 5,8% осіб з гепатобіліарними порушеннями нез'ясованого генезу». У відповідному розділі власних досліджень було б доцільно надати детальну інформацію щодо вказаних отриманих даних.

17. Авторкою також неодноразово наведено окремі детальні описи абсолютної кількості осіб з визначеними генотипами, а не відносні, які не порівняно з даними літератури та не проаналізовано (с. 110, 112, 115-116, 125-130).

18. Згідно задачі 6, було б доцільно доповнити останній висновок інформацією щодо створеного алгоритму генетичного дослідження, оскільки результати та алгоритм представлені в роботі.

19. Які результати відповідають задачі 3?

20. Про які вибірки написано, якщо досліджується контрольна група, на стор. 88 – «Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним в обох популяційних вибірках свідчить про випадковий розподіл генотипів у відповідності з розподілом Харді-Вайнберга»?

21. Як Ви пояснюєте результати (с. 89), згідно з якими у контрольній групі практично здорових осіб «Частота гомозиготного генотипу $A(TA)_7TAA/A(TA)_7TAA$, який асоціюється з розвитком синдрому Жильбера серед вибірки практично здорових жителів Західного регіону України становить 11,7%»? Вказані 11,7% осіб повинні бути хворі? Якщо ні, то чому? Що відомо про генетичні особливості гомозигот за досліджуваним алелем?

22. З якою метою у підрозділі 3.3. на с.113 представлено територіальний розподіл пацієнтів з хворобою Вільсона?

23. Яким чином було оцінено «Ефективність впровадження в практику генетичного тестування мутацій $c.3207C>A$ та $c.2304dupC$ гена $ATP7B$ серед осіб із підозрою хвороби Вільсона» (підрозділ 3.4.)? Аргумент «Оскільки, мутація $c.2304dupC$ виявлена в чотирьох пацієнтів з дослідженої вибірки, вважаємо її частою для жителів України» не є переконливим.

24. Як було оцінено інформативність генетичного тестування алельних варіантів досліджуваних генів, про яку йдеться у узагальнюючому висновку?

Але усі зазначені недоліки та питання, які виникли в процесі рецензування, не впливають на позитивне враження від роботи та не зменшують її теоретичного та практичного значення.

Висновок. Дисертаційна робота Шиманської Іванни Єлисеївни «Мутації гена *ATP7B* у пацієнтів з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями та хворобою Вільсона» є завершеною науково-дослідною роботою, в якій представлено рішення важливої наукової проблеми – встановлення спектру і частоти мутацій гена *ATP7B* серед осіб високого ризику хвороби Вільсона в Україні та створення алгоритму визначення мутацій генів, які зумовлюють ідіопатичні гепатобіліарні порушення. Дисертаційна робота за своєю актуальністю, новизною, теоретичним значенням та практичною цінністю, глибиною та обсягом проведених досліджень цілком відповідає встановленим вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 року № 44, та Вимогам до оформлення дисертації, затвердженим наказом МОН України від 12.01.2017 року № 40, які пред'являються до дисертаційних робіт на здобуття ступеня доктора філософії, а її автор, І. Є. Шиманська, заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – «Біологія».

доктор біологічних наук,
професор кафедри акушерства та гінекології
Харківського національного університету
імені В.Н.Каразіна

Олена ФЕДОТА